

КИРИЛЛОВА ЮЛИЯ МАРСЕЛЬЕВНА

**ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА СУБТИЛИЗИНОПОДОБНОЙ ПРОТЕИНАЗЫ
Bacillus intermedius В РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММАХ *Bacillus subtilis***

03.00.07 – микробиология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань – 2006

Работа выполнена в лаборатории биосинтеза и биоинженерии ферментов кафедры микробиологии ГОУВПО Казанский государственный университет им. В.И.Ульянова-Ленина

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Шарипова Маргарита Рашидовна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, старший научный сотрудник Коксин Владимир Петрович
(РЦПБ СПИД и ИЗ МЗ РТ, г. Казань)

кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник Давыдова Марина Николаевна
(Казанский институт биохимии и биофизики РАН, г. Казань)

Ведущая организация: Московский государственный университет,
кафедра микробиологии, г. Москва

Защита диссертации состоится _____ 2006 г. в _____ часов на заседании Диссертационного совета Д 212.081.08 при Казанском государственном университете, 420008, г.Казань, ул.Кремлевская, 18

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского Казанского государственного университета

Автореферат разослан _____ 2006 г.

И.о. ученого секретаря
диссертационного совета доктор
биологических наук, профессор

З.И.Абрамова

Актуальность проблемы. В основе механизма адаптации бактерий лежит способность экспрессировать гены, которые обеспечивают максимальный рост в неблагоприятных условиях их существования. Для мониторинга и ответа клетки на разнообразие внешних сигналов служит сложноорганизованная сеть сигнальной трансдукции, в основе которой лежит двухкомпонентная система регуляции экспрессии генов. Бактерии, относящиеся к роду *Bacillus*, реагируют в ответ на изменившиеся условия синтезом различных внеклеточных ферментов для всестороннего использования альтернативных источников питания, секрецией антибиотиков, индукцией подвижности и, в конечном итоге, инициацией споруляции. Бактериальное спорообразование является простой моделью клеточной дифференцировки и характеризуется последовательными и радикальными изменениями в физиологии бактериальной клетки, обусловленными активацией определенных генов регуляторной системой Sro0A-фосфопередачи. Оценить роль этой системы в контроле экспрессии генов можно с использованием штаммов, мутантных по составляющим ее регуляторным белкам. Поскольку протеиназы бацилл, относящиеся к «поздним» белкам, широко используются в практическом отношении, знание молекулярных механизмов регуляции синтеза этих ферментов позволит целенаправленно влиять на уровень их продукции. Результаты исследования регуляции экспрессии соответствующих генов могут быть использованы в биотехнологии, например, для повышения выхода целевых белков путем клонирования и модификации соответствующих генов.

Грамположительные спорообразующие бактерии *B.intermedius* секретируют различные сериновые протеиназы, одна из которых относится к группе субтилизиноподобных сериновых протеиназ, обладающих широкой субстратной специфичностью (Балабан с соавт., 1993). Фермент был выделен из культуральной жидкости, очищен до гомогенного состояния, изучены его физико-химические свойства. Клонирование гена субтилизиноподобной сериновой протеиназы *B.intermedius* открыло возможность для исследования механизмов регуляции синтеза фермента и его взаимосвязи с клеточной физиологией.

Целью работы явилось выяснение механизмов контроля экспрессии гена субтилизиноподобной сериновой протеиназы *B.intermedius*, продуцируемой рекомбинантными штаммами *B.subtilis* на разных стадиях роста бактерий.

В работе решались следующие **задачи**:

1. Изучение регуляции биосинтеза субтилизиноподобной протеиназы *B.intermedius* рекомбинантным штаммом *B.subtilis*.
2. Определение значимости катаболитной репрессии в регуляции экспрессии гена субтилизиноподобной протеиназы *B.intermedius* на разных фазах роста рекомбинантным штаммом *B.subtilis*.
3. Выяснение роли регуляторных белков - компонентов сигнально-сенсорной системы KinA/Spo0F/Spo0A в регуляции экспрессии гена субтилизиноподобной протеиназы *B.intermedius*.
4. Определение вклада *Spo0E*, *Spo0K* - белков, участвующих в инициации спорогенеза, в регуляцию экспрессии гена субтилизиноподобной протеиназы *B.intermedius* рекомбинантными клетками *B.subtilis*.
5. Исследование влияния спороспецифичных σ^H и σ^E -факторов транскрипции на экспрессию гена субтилизиноподобной протеиназы *B.intermedius*.

Исследования поддержаны грантами РФФИ 01-04-48037, 05-04-48182, Академии Наук Республики Татарстан 03-3.10-295 и программой CRDF Rec 007.

Научная новизна. В работе установлены основные закономерности экспрессии гена субтилизиноподобной сериновой протеиназы *B.intermedius*, которая синтезируется и секретируется в период стационарного роста рекомбинантного штамма *B.subtilis*. Впервые показано, что в поздней стационарной фазе роста экспрессия гена субтилизиноподобной протеиназы не регулируется по типу катаболитной репрессии, в отличие от фермента, синтезируемого в начале стационарной фазы роста. Получены приоритетные данные, свидетельствующие о том, что экспрессия гена субтилизиноподобной протеиназы *B.intermedius* подвергается позитивной регуляции со стороны регуляторных белков – компонентов системы сигнальной трансдукции KinA/Spo0F/Spo0A и спороспецифичных σ^H и σ^E – факторов транскрипции. Выявленные закономерности расширяют представления о функционировании субтилаз у бацилл.

Практическая ценность работы. Полученные нами сведения о механизмах контроля экспрессии гена субтилизиноподобной протеиназы на разных стадиях роста, включая переход к клеточной дифференцировке, могут быть полезны при разработке стратегии синтеза ферментов промышленными штаммами бацилл. Данные о механизмах функционирования регуляторных систем катаболитных генов, экспрессия которых продолжается при переходе клеток в состояние анабиоза, могут

послужить основой для направленной модификации промоторной области гена с целью получения высокопродуктивных штаммов в условиях ограниченного роста бацилл. Разработаны среды культивирования для выделения протеиназ, соответствующих разным стадиям роста бацилл.

Апробация работы. Материалы диссертации представлены на Международном конгрессе FEMS “Bacillus-2003” (Словения, 2003), Международном конгрессе “Биотехнология – состояние и перспективы развития” (Москва, 2002), Международных научных студенческих конференциях “Студент и научно-технический прогресс” (Новосибирск, 2002, 2003, 2005), научных конференциях программы CRDF “Материалы и технологии XXI века” (Казань, 2000, 2001, 2003, 2005), школах-конференциях для молодых ученых “Биология – наука XXI века” (Пушино, 2003), XII юбилейной конференции “Ферменты микроорганизмов” (Казань, 2001), Всероссийском конкурсе на лучшую научную работу (Томск, 2002), IV научно-практической конференции молодых ученых и специалистов республики Татарстан (Казань, 2001), республиканском конкурсе научных работ среди студентов и аспирантов на соискание премии им. Н.И. Лобачевского (Казань, 2001, 2002).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 17 работ.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, обсуждения результатов, выводов и списка литературы. Работа изложена на 143 страницах машинописного текста, содержит 4 таблицы и 38 рисунков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали штамм *B.intermedius* 3-19 из коллекции Казанского государственного университета, штамм *B.subtilis* AJ73, дефектный по собственным внеклеточным протеиназам, любезно предоставлен для работы проф. Ю.Йомантасом (Институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов), штаммы *B.subtilis*, дефектные по *spo0*-, *kin*-, *sig*- генам, а также соответствующие им штаммы с полноценными системами регуляции получены из Bacillus Genetic Stock Center (университет Охайо, США). В работе использовали мультикопийную плазмиду pCS9, сконструированную на основе вектора pCB22, с геном субтилизиноподобной протеиназы *B.intermedius* под собственным промотором, которая получена и любезно предоставлена для работы проф. С.В. Костровым, Институт молекулярной генетики РАН.

Культивирование мутантных штаммов *B.subtilis* проводили на среде LB (Sambrook et al., 1989). При культивировании клеток рекомбинантного штамма *B.subtilis* AJ73 (pCS9) в качестве исходной использовали среду следующего состава (%): пептон – 2.0; дрожжевой экстракт – 1.0; $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ - 0.1; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0.05; NaCl - 0.3; MnSO_4 - 0.01; NH_4Cl - 0.01; Na_2HPO_4 - 0.035; pH - 8.5. При культивировании клеток *B.intermedius* 3–19 в качестве исходной использовали среду следующего состава (%): пептон - 2.0; $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ - 0.06; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0.05; NaCl - 0.3; MnSO_4 - 0.01; NH_4Cl - 0.02; Na_2HPO_4 - 0.02; pH - 8.5.

В среду добавляли эритромицин в концентрации 20 мкг/мл, т.к. плазида pCS9 несет ген устойчивости к данному антибиотику. Раствор неорганического фосфата (Na_2HPO_4), растворы NH_4Cl и $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_7(\text{NH}_4)_2$, желатина, казеина, дрожжевого экстракта, глюкозы (1%) и других углеводов, цитрата натрия, а также растворы аминокислот (в конечной концентрации L-аминокислоты - 50 мг/л, DL-аминокислоты - 100 мг/л) и солей металлов вносили стерильно перед посевом.

Прирост биомассы измеряли нефелометрически на КФК-2 при 590 нм. Удельную активность определяли как отношение активности фермента в культуральной жидкости к количеству биомассы и выражали в условных единицах или процентах. Активность субтилизиноподобной протеиназы определяли по гидролизу синтетического хромогенного субстрата Z-Ala-Ala-Leu-pNa (Люблинская с соавт., 1977). Активность β -галактозидазы определяли по методу, описанному в работе (Миллер, 1976).

Для выявления эндоспор мазок окрашивали по Граму (Гусев, Минеева, 1992). Подсчет клеток со спорами проводили в режиме фазово-контрастной микроскопии не менее чем в 5-ти полях зрения. Подсчитывали общее количество вегетативных и спорулирующих клеток (100%), число последних выражали в процентах. Споры также выявляли с помощью метода, основанного на обработке хлороформом, при последующем высеве на чашку титрования и подсчета жизнеспособных колоний (Ferrari et al., 1988). Фазы спорообразования рассчитывали, как описано в работе (Шлегель, 1987).

Выделение плазмид проводили стандартными методами (Гловер, 1988). Трансформацию клеток *B.subtilis* проводили, как описано в работе (Anagnostopoulous, Spizizen, 1961).

Статистическую обработку результатов проводили в программной среде Microsoft Exel путем расчета среднеквадратичного отклонения (σ). Результаты

считали достоверными при среднеквадратичном отклонении $\sigma \leq 15\%$. В качестве критерия достоверности получаемых разностей использовали критерий Стьюдента, принимая $P \leq 0.05$ за достоверный уровень значимости.

Наряду с традиционными методами исследования влияния экзогенных факторов проводили многофакторные эксперименты. Обработка результатов экспериментов проводилась с помощью программы STATGRAPHICS Plus for Windows.

Регуляторную область гена *apr* Bi (AY754946) анализировали при использовании программы BLAST network (Altschul et al., 1997), представленной на сервере the National Center for Biotechnology Information's (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

I. Закономерности синтеза субтилизиноподобной протеиназы *B.intermedius* рекомбинантным штаммом *B.subtilis*

Исходный штамм *B.intermedius* 3-19 обладает способностью синтезировать субтилизиноподобную сериновую протеиназу с молекулярной массой 30 кД, изоэлектрической точкой 9,1-9,3 (Балабан с соавт., 1993). Полный ген фермента клонирован на мультикопийной плазмиде pCS9. Для изучения экспрессии гена плазмиду трансформировали в протеазо-дефицитный штамм *B.subtilis* AJ73, поскольку нативный штамм *B.intermedius* секретирует в среду несколько внеклеточных протеолитических ферментов - субтилизиноподобную протеиназу, глутамилэндопептидазу и металлопротеазу. Синтез каждого из них может корегулироваться определенными факторами среды, что затрудняет анализ продукции каждого из ферментов у исходного штамма.

1. Динамика роста бактерий, биосинтеза субтилизиноподобной протеиназы *B.intermedius* и спорообразования рекомбинантного штамма *B.subtilis*. На рис. 1 представлены динамика роста и накопления активности протеиназы в культуральной жидкости рекомбинантного штамма *B.subtilis* AJ73 (pCS9). Характер роста и накопления активности фермента сохраняются такими же, как у исходного штамма *B. intermedius* 3-19: обнаружены два пика протеолитической активности на 28-й и 48-й ч, что соответствуют ранней и поздней стационарной фазе роста бактерий. Эти результаты свидетельствуют о корректном протекании процессов биосинтеза субтилизиноподобной протеиназы *B.intermedius* в рекомбинантных клетках *B.subtilis* и об адекватности использованной нами векторной системы для изучения экспрессии гена протеиназы. Удельная скорость накопления субтилизиноподобной протеиназы

(ϵ) в культуральной жидкости рекомбинантного штамма нарастала в период, когда удельная скорость роста культуры (μ) падала (рис. 1). Уровень накопления “позднего” фермента в 3 раза превышает таковой в ранней стационарной фазе.

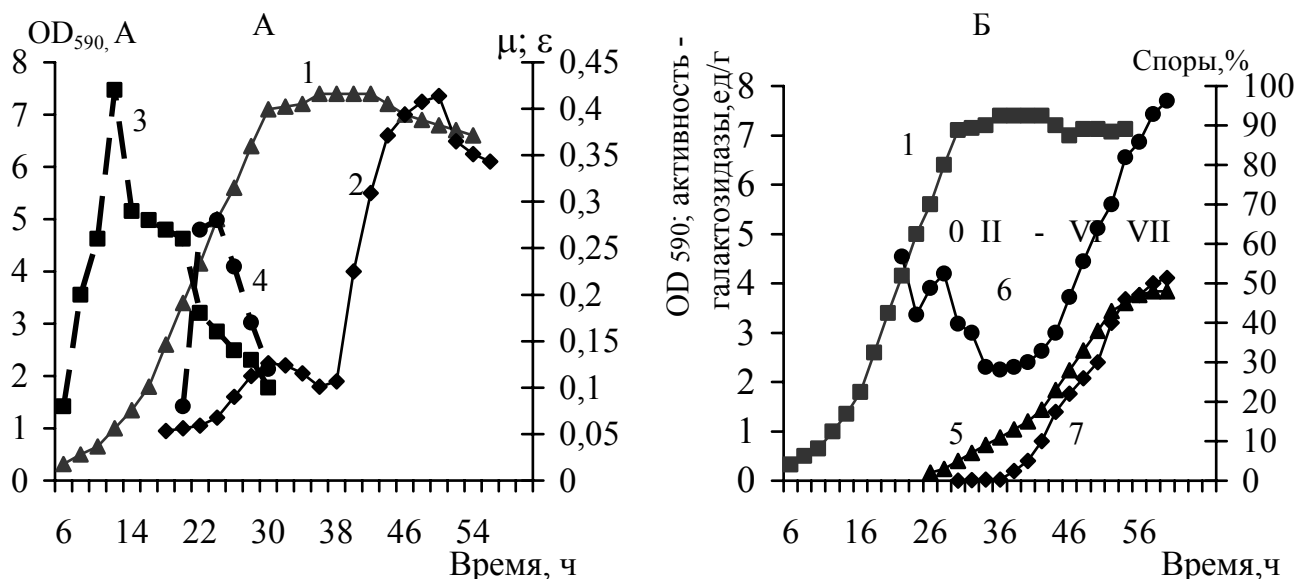


Рис. 1. Динамика роста (1), протеолитической активности (2), удельной скорости роста (μ) (3), и удельной скорости накопления фермента (ϵ) (4), спорообразования (5), β -галактозидазной активности (6) и количество спор (7), полученных путем титрования хлороформустойчивых форм, рекомбинантного штамма *B. subtilis* AJ73 (pCS9) ($\sigma \leq 10\%$)

С применением репортерного белка β -галактозидазы, нами установлено, что второй пик протеолитической активности не является результатом накопления белка в культуральной жидкости вследствие лизиса клеток, а секретируется рекомбинантным штаммом *B. subtilis* AJ73 (pCS9) и по времени соответствует стадиям созревания эндоспоры (стадии V-VI, рис. 1). Итак, образование первого пика протеиназы рекомбинантным штаммом соответствует стадии инициации споруляции, второго – стадии созревания эндоспор и автолиза спорангия.

2. Влияние факторов среды на экспрессию гена субтилизиноподобной протеиназы *B. intermedius* рекомбинантным штаммом *B. subtilis*. Для выяснения условий биосинтеза субтилизиноподобной протеиназы *B. intermedius* рекомбинантным штаммом *B. subtilis* провели исследование влияние ряда факторов среды на эффективность продукции фермента в стационарной фазе роста.

Влияние пептона и неорганического фосфата на экспрессию гена протеиназы. В результате постановки многофакторных экспериментов установлены различия в содержании основных компонентов питательной среды – пептона и неорганического фосфата. В ранней стационарной фазе роста рекомбинантного штамма для синтеза

фермента требуется меньшая концентрация неорганического фосфата (0,24 г/л) в среде и большая концентрация пептона (30 г/л), чем для биосинтеза фермента исходным штаммом *B.intermedius*. Потребность в пептоне для продукции фермента рекомбинантным штаммом, как в ранней, так и в поздней стационарной фазе возрастает по сравнению с исходным штаммом в 1,1-1,4 раза. Возможно, это объясняется большей потребностью в источниках питания для клеток рекомбинантного штамма. Нами показано, что для биосинтеза протеиназы в поздней стационарной фазе роста потребность бактерий в фосфоре и пептоне незначительно отличается от соответствующих данных для синтеза фермента в раннем стационаре того же штамма.

Влияние белковых субстратов и дрожжевого экстракта на экспрессию гена протеиназы. Удельная активность бактерий *B.subtilis* AJ73 (pCS9) в отношении синтеза протеиназы первого и второго пика увеличивается при внесении в питательную среду казеина и желатина в концентрациях 0,5% и 1% (рис. 2). Однако для активации биосинтеза субтилизиноподобной протеиназы рекомбинантным штаммом в поздней стационарной фазе роста (на 48-й час) необходимы более низкие концентрации добавок по сравнению с “ранним” ферментом.

При исследовании влияния дрожжевого экстракта на экспрессию гена субтилизиноподобной протеиназы рекомбинантным штаммом, установлено, что его внесение в среду культивирования в концентрации 0,5% оказывало положительный эффект на синтез “раннего” фермента (увеличение в 1,5 раза) и незначительно стимулировало синтез “позднего”.

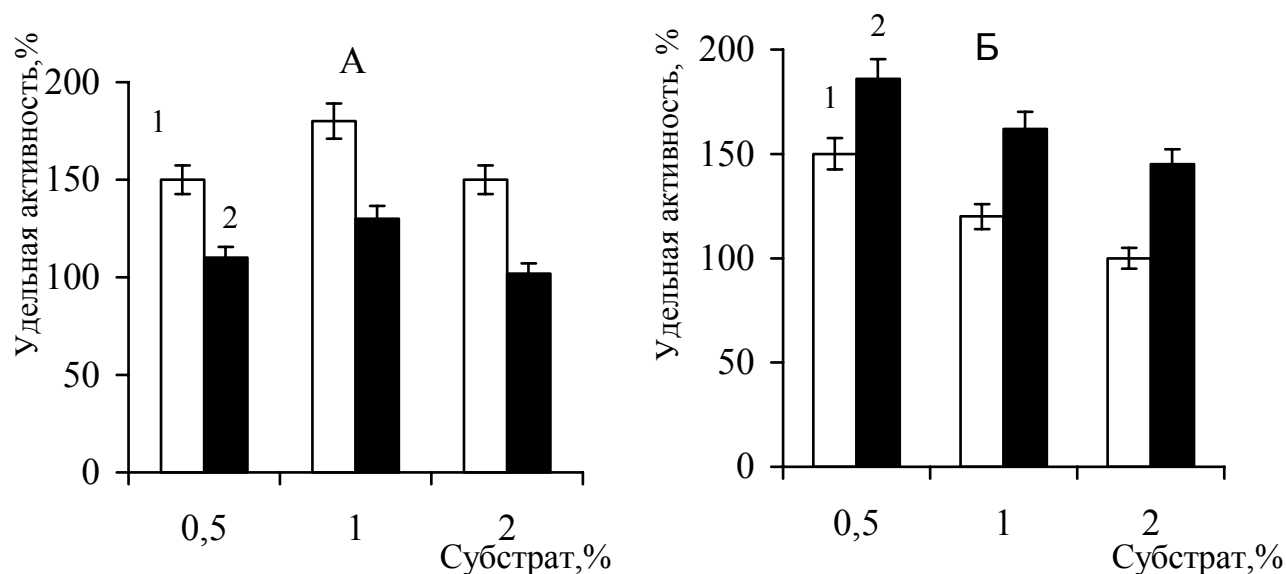


Рис. 2. Влияние желатина (1) и казеина (2) на продукцию субтилизиноподобной протеиназы рекомбинантным штаммом *B.subtilis* на 28-й (А) и 48-й (Б) часы культивирования. За 100 % приняты значения удельной активности на среде, не содержащей органических субстратов.

Дальнейшее увеличение концентрации дрожжевого экстракта до 2% приводило к снижению удельной активности фермента на 60% - 90%. По-видимому, низкие концентрации дрожжевого экстракта необходимы рекомбинантному штамму *B.intermedius* в качестве дополнительного фактора роста. Однако его более высокие концентрации, возможно, регулируют синтез фермента по типу репрессии конечным продуктом. Изменения в уровне экспрессии гена *apr Vi* на разных стадиях роста под влиянием различных экзогенных факторов свидетельствуют о возможных изменениях в регуляции синтеза фермента на разных фазах роста.

Влияние сахаров на экспрессию гена протеиназы. Для сериновых протеиназ описана репрессия синтеза ферментов глюкозой. У рекомбинантных штаммов потребность в легкоусвояемых источниках углерода может быть иной, чем у исходного штамма. При исследовании воздействия различных моносахаридов (глюкоза, галактоза, маннит) и дисахаридов (сахароза, мальтоза, лактоза) на продукцию рекомбинантным штаммом субтилизиноподобной протеиназы *B.intermedius*, нами установлено, что во всех случаях рост рекомбинантного штамма интенсифицировался, параллельно снижалась удельная активность субтилизиноподобной протеиназы (рис. 3).

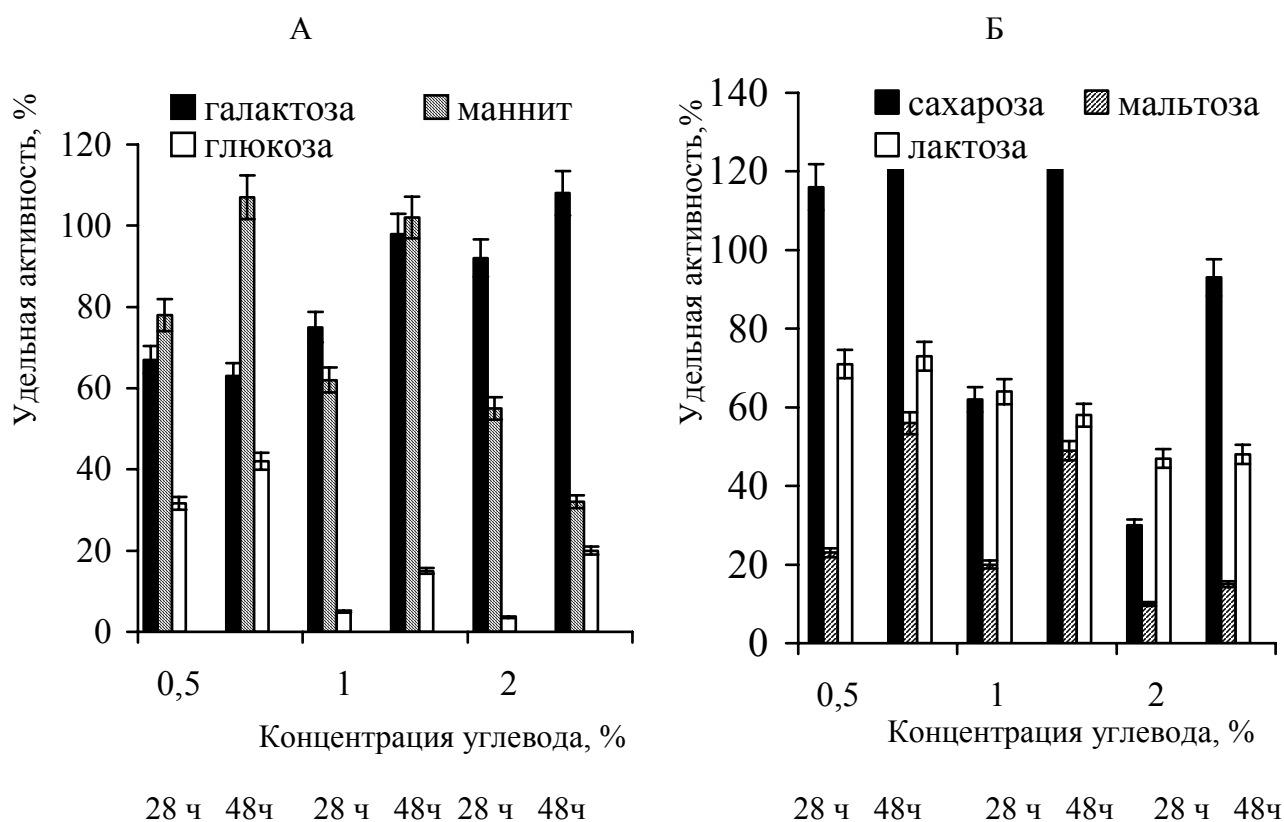


Рис. 3. Влияние моно- (А) и дисахаридов (Б) на продукцию субтилизиноподобной протеиназы рекомбинантным штаммом *B.subtilis* на 28-й и 48-й часы культивирования. За 100% приняты значения удельной активности на среде, не содержащей сахаров.

Ингибирующее действие более выражено в отношении глюкозы и мальтозы. Повышение концентрации экзогенных сахаров до 2 %, приводило к увеличению эффекта ингибирования синтеза фермента. Эффект репрессии в большей степени наблюдался по отношению к субтилизиноподобной сериновой протеиназе ранней стационарной фазы роста. В меньшей степени понижение удельной активности субтилизиноподобной протеиназы на обеих фазах роста вызывали лактоза, галактоза и маннит (30-60%). Низкие концентрации сахарозы (0,5 %) оказывали стимулирующее действие на биосинтез фермента в раннем и позднем стационаре (на 20-40%), увеличение ее концентрации до 2 % приводило к снижению удельной активности фермента в поздней стационарной фазе роста (на 10%). По нашим данным, экспрессия гена субтилизиноподобной протеиназы регулируется по механизму катаболитной репрессии глюкозой. Возможно, что невысокие концентрации (0,5%-1%) других легкоусвояемых источников углерода, таких как сахароза и маннит, необходимы для роста и синтеза фермента рекомбинантным штаммом в качестве дополнительного источника углерода.

Влияние ионов двухвалентных металлов на экспрессию гена протеиназы. Ионы двухвалентных металлов и, в частности, ионы Ca^{2+} играют важную роль при формировании каталитически активной конформации протеиназ (Siezen et al., 1991). В третичной структуре субтилаз (термитазы и протеиназы K) обнаружены три поверхностных Ca - связывающих сайта (Betzel et al., 1990). Ионы Ca^{2+} стабилизируют третичную структуру фермента, повышая термостабильность и препятствуя частичному разворачиванию белковой глобулы. Последовательное удаление поверхностных Ca -связывающих сайтов из структуры белковой глобулы путем делеций образующих их аминокислотных остатков приводило к снижению молекулярной активности субтилизина на 10-20%, вследствие неправильного сворачивания белка (Leloup et al., 1997). Нами изучено влияние ионов двухвалентных металлов на накопление субтилизиноподобной протеиназы *B.intermedius* рекомбинантным штаммом *B.subtilis* в ранней и поздней стационарной фазе роста. Оптимальным условием для биосинтеза субтилизиноподобной протеиназы ранней стационарной фазы является присутствие в среде ионов Ca^{2+} (5 мМ) (рис. 4). Активация ионами Ca^{2+} эффективнее выражена в отношении фермента, синтезируемого рекомбинантными клетками на 48-й ч роста.

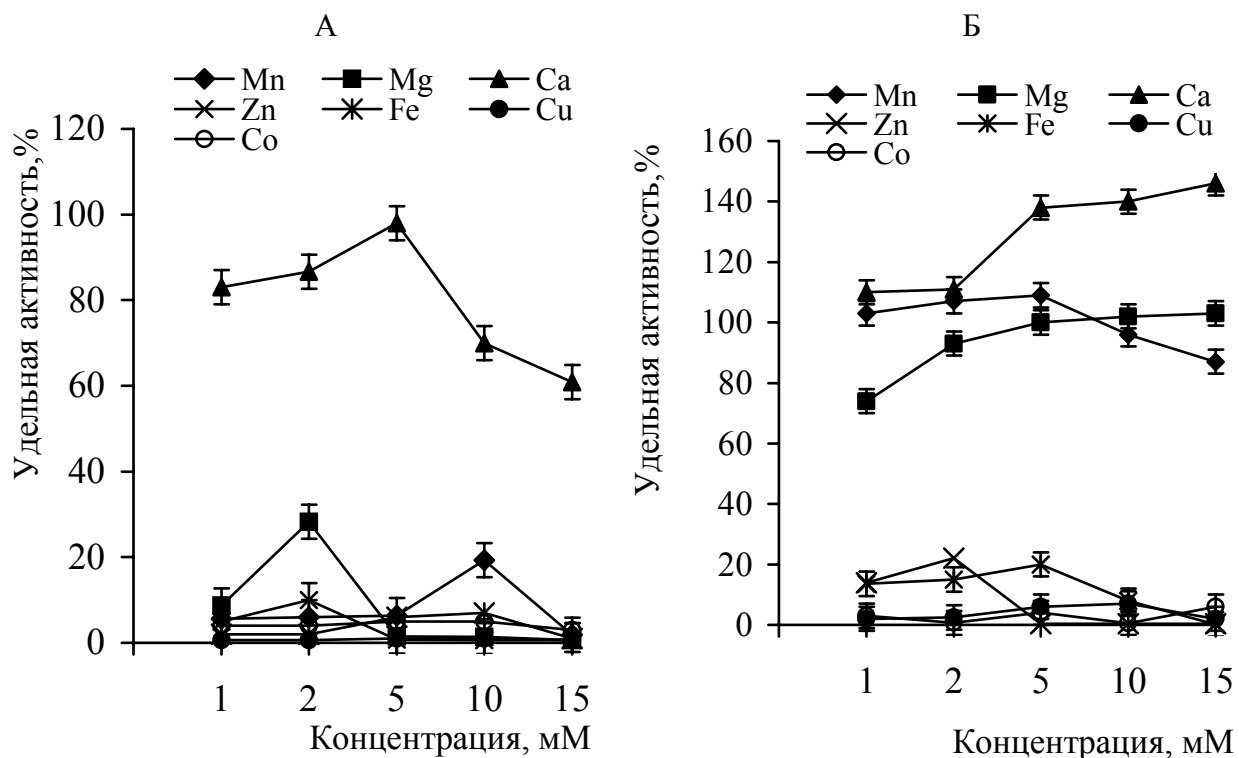


Рис. 4. Влияние ионов двухвалентных металлов на продукцию субтилизиноподобной протеиназы рекомбинантным штаммом *B.subtilis* AJ73 (pCS9) на 28-й (А) и 48-й (Б) часы культивирования.

Интересные данные получены при исследовании влияния ионов Mg^{2+} и Mn^{2+} : оба подавляли активность фермента в раннем стационаре и не влияли на уровень активности протеиназы на 48 час роста. Остальные ионы металлов Zn^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} и Cu^{2+} (1-15 мМ) подавляли рост и биосинтез протеиназы в ранней и поздней стационарной фазе роста (рис. 4).

Влияние аминокислот на экспрессию гена протеиназы. Протеиназы целесообразно рассматривать не только как деградативные ферменты, но и как ферменты, создающие запасы аминокислот для биосинтетических целей. Исследовали влияние на экспрессию гена субтилизиноподобной протеиназы *B.intermedius* рекомбинантным штаммом индивидуальных аминокислот и их комплексов. Установлен стимулирующий эффект на синтез фермента цистеина (180%), гистидина (150%), аспарагина (140%), триптофана (140%), глутамина (130%), и глутамата (130%) (рис. 5). Лейцин стимулировал биосинтез фермента ранней стационарной фазы и не влиял на продукцию позднего фермента. Остальные аминокислоты не оказывали влияния на синтез фермента (рис. 5).

Нами показано, что казаминовые кислоты в концентрации 0,1-1% стимулировали продукцию протеиназы рекомбинантным штаммом на 20-50%.

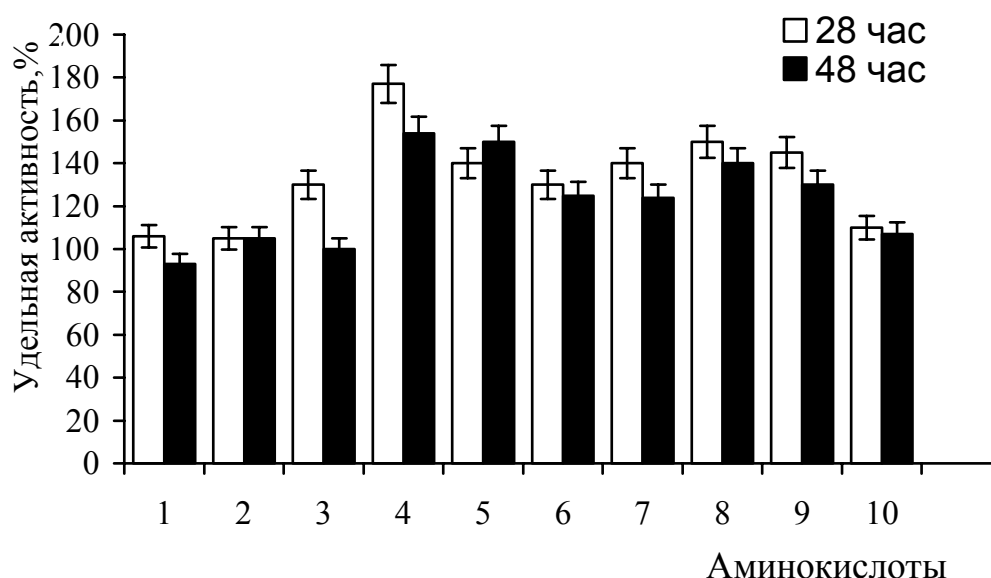


Рис. 5. Влияние индивидуальных аминокислот на продукцию субтилизиноподобной протеиназы рекомбинантным штаммом *B.subtilis* AJ73 (pCS9) на разных фазах роста. За 100% принята удельная активность культуры в отношении синтеза протеиназы без добавления аминокислот в среду 1- L-аланин; 2 – L-валин; 3 – DL-лейцин; 4 – DL-цистеин; 5 – DL-аспарагин; 6 – DL-глутамин; 7 – DL-триптофан; 8 – DL-гистидин; 9 – DL-глутаминовая кислота; 10 – L-аспарагиновая кислота (L - 50 мг/л, DL - 100 мг/л).

Увеличение концентрации до 2 % приводило к ингибированию синтеза фермента. Стимулирующий эффект аминокислот и их комплексов, по-видимому, связан с их использованием бактериями в качестве дополнительного источника азота необходимого для культивирования рекомбинантного штамма.

Таким образом, закономерности синтеза субтилизиноподобной протеиназы *B.intermedius* рекомбинантными клетками *B.subtilis* в стационарной фазе роста не отличаются от таковых для синтеза других сериновых протеиназ бактерий: биосинтез фермента активируется в присутствии белковых субстратов – казеина и желатина, неорганического фосфата, ионов кальция. Однако каждый из исследуемых экзогенных факторов не одинаково влияет на синтез фермента на разных стадиях, и это может быть отражением смены механизмов регуляции фермента в стационарной фазе роста. Характерной особенностью является отсутствие подавления синтеза фермента в поздней стационарной фазе роста легкометаболизируемыми источниками углерода по типу катаболитной репрессии, что также свидетельствует в пользу предположения о смене механизмов регуляции экспрессии гена протеиназы в поздней стационарной фазе роста.

II. Взаимосвязь синтеза внеклеточной субтилизиноподобной сериновой протеиназы со спорообразованием

Образование стратегических ферментов - внеклеточных протеиназ, участвующих в белковом обмене между клеткой и средой, связывают с различными физиологическими процессами бактерий, и в частности, со споруляцией. Спорообразование – это сложный процесс клеточной дифференцировки, приводящий к образованию материнской клеткой зрелых эндоспор, которые затем освобождаются в среду. Обычно процесс эндогенного спорообразования стимулируется недостатком питательных веществ в среде. По нашим данным в период перехода вегетативных клеток к спорообразованию бациллы продолжают эффективно секретировать протеиназы.

1. Роль катаболитной репрессии в регуляции экспрессии гена протеиназы на разных фазах роста рекомбинантного штамма и спорообразовании. Нами установлено, что добавление 1% глюкозы к исходной среде до начала культивирования или в период ранней стационарной фазы роста вызывало снижение количества спор на 90 %. Внесение глюкозы на 26-й час роста и далее приводило к снижению количества спор на 8-10 %. Таким образом, наличие глюкозы в среде до стадии инициации приводит к полному или частичному подавлению споруляции по механизму катаболитной репрессии, внесение глюкозы после инициации спорообразования не оказывает влияния на дальнейшее осуществление процесса цитодифференцировки.

При исследовании влияния глюкозы (1 %), внесенной в питательную среду на разные часы роста культуры, на экспрессию протеиназы рекомбинантным штаммом *B.subtilis*, нами установлено, что ее добавление в среду до начала культивирования или в период ранней стационарной фазы роста на 21-й, 24-й и 26-й часы роста резко снижало уровень синтеза фермента (рис. 6). Внесение глюкозы в среду культивирования на 28-й ч и позже после инициации процесса спорообразования не вызывало последующего снижения уровня удельной активности протеиназы. Из полученных данных следует, что катаболитная репрессия регулирует биосинтез “раннего” фермента и не влияет на синтез “позднего”. Эти данные свидетельствуют, что при переходе бактерий к клеточной дифференцировке происходит смена механизмов регуляции экспрессии поздних генов, которые также активны в период стационарного роста, но их активация, по-видимому, происходит иными способами, чем в период вегетативного роста.

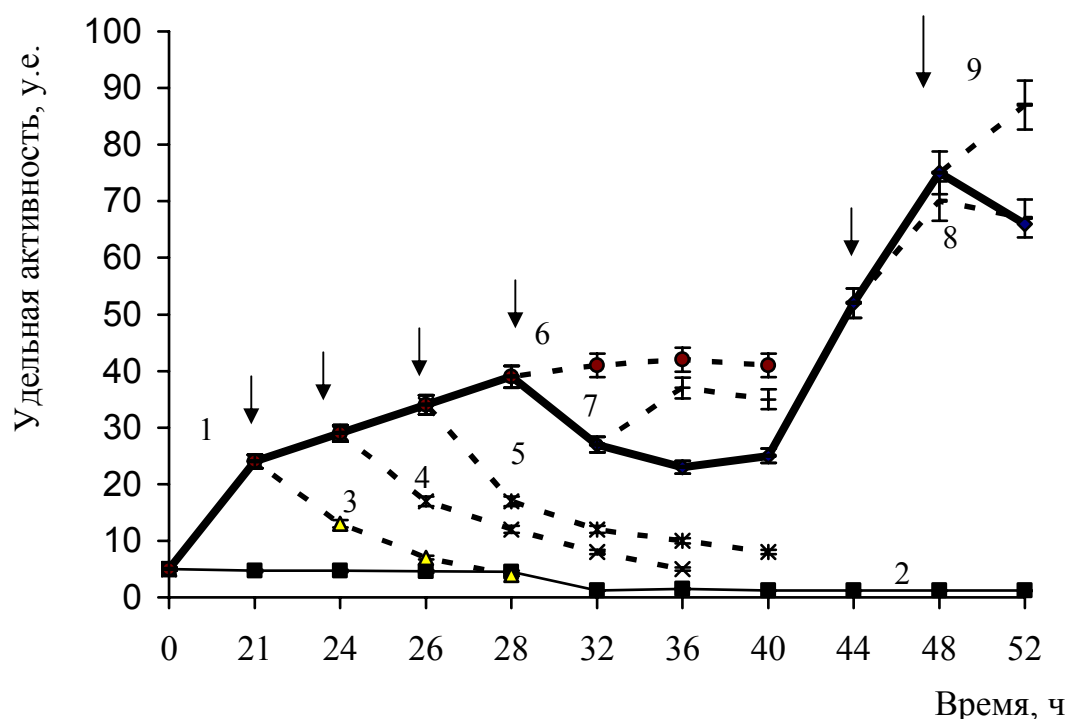


Рис. 6. Влияние глюкозы на удельную активность субтилизиноподобной протеиназы рекомбинантного штамма *B.subtilis* AJ73 (pCS9). Стрелками указано время внесения глюкозы (1%-й) в среду культивирования. 1 – удельная активность на среде без глюкозы, 2 – удельная активность на среде с глюкозой, 3–9 – удельная активность на средах с глюкозой, внесенной на разные часы роста.

2. Влияние *spo0A* мутаций на экспрессию гена субтилизиноподобной сериновой протеиназы *B.intermedius*. При переходе бактерий к споруляции ключевая роль принадлежит регуляторному белку Spo0A. Синтез многих клеточных белков, экспрессия которых продолжается в этот период, находится под его положительным контролем. Представляло интерес провести поиск Spo0A-боксов (TGNCGAA) в промоторной области гена *apr* Vi субтилизиноподобной протеиназы *B.intermedius*.

Анализ нуклеотидной последовательности позволил выявить участки с 70–86% гомологией для взаимодействия со специфическим регуляторным белком Spo0A (рис. 7). Они располагаются в виде прямых tandemных повторов. Такое строение промоторной области должно способствовать увеличению частоты инициации транскрипции в условиях активации Spo0A-белка.

Выявленные сайты регуляции в промоторной области гена *apr* Vi позволили предположить возможное участие двухкомпонентной системы Spo0A-фосфопередачи в регуляции экспрессии гена *apr* Vi.

1 GAATGGAAGGTCCTTGATTACAACGTGGTCAGCCATTTACTCCATCCTCCCCTT
 55 TT¹TAAAGAACCTGTTATTGTAACAGGTTNTTTTNAAT²TGCCAAAACCAAAAAAT
 109 AATATTTTTTTTA³TATCGAAATTTCGAAATAGATGCTAGACGTTTCTACCTATTTTA
 164 AGGCTTTTTCGGG⁴TATCGAATATTTGTCCGAAATGGATCATAAGAAAAAAGCAC
 219 ACTTCCTTTTTTAATAGATAAC⁵CGCTGAAACAGCAGAACAAACATATTTTCCCAAC
 274 GTTTC⁶CAAG⁷TGACTTAATTCCCAATTTTCGCTAGGACTTTTCACAAAAATTTCGGG
 329 TCTACTCTTATT⁸TGCCTACTTCCCTTAAACTGAATA⁹TACAGAATAATC¹⁰AAACGAA
 384 TCAT⁻³⁵TTCTTATAGA⁻¹⁰CTACGAATGATTATTCTGA^{SD}AATAAGAAAAAAGGGATGTGGAT
 439 TGTGC^{GTG}GAAAAAGAAAAATGTGATG

Рис. 7. Промотор гена *apr* Вi. Последовательность Шайна-Дельгарно (SD), сайт инициации трансляции (GTG) выделен жирным, -10 и -35 области обозначены жирным, курсивом и подчеркнуты. Потенциальные Spo0A-боксы выделены рамкой. Участки с 86% гомологией к Spo0A-боксу: (2; 3; 4; 7; 8; 9; 10), участки с 71% гомологией: (1; 5; 6). TGNCGAA – Spo0A-бокс.

Система Spo0A-фосфопередачи, участвующая в инициации споруляции, основана на фосфорилировании Spo0A фактора транскрипции путем передачи фосфата от множественных гистидин киназ на переносчики фосфата Spo0F и Spo0B и затем на Spo0A белок (рис. 8). Spo0A~P специфически дефосфорилируется фосфатазой Spo0E, а Spo0F~P – фосфатазами Rap-семейства (Perego, Brannigan, 2001), последние ингибируются специфическими олигопептидами, поступающими в клетку через цитоплазматическую мембрану (Reizer et al., 1997). Транспорт олигопептидов в клетку контролируется мембраносвязанным белком Spo0K (Perego, Brannigan, 2001).

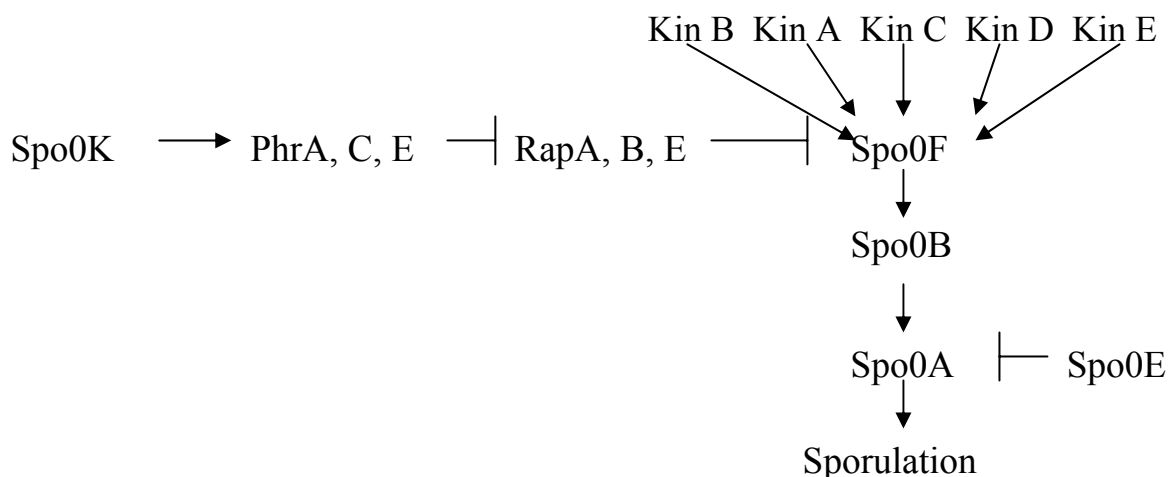


Рис. 8. Инициация спорообразования. (Piggot, Hilbert, 2004).

Исследовали характер экспрессии гена субтилизиноподобной сериновой протеиназы в различных штаммах *B.subtilis*, мутантных по гену *spo0A*, трансформированных плазмидой pCS9 (рис. 9). Установлено более чем 98%-ое ингибирование протеолитической активности субтилизиноподобной протеиназы по сравнению с контрольным штаммом с полноценным геном *spo0A*. По-видимому, Spo0A белок, участвует в позитивной регуляции экспрессии гена субтилизиноподобной протеиназы *B.intermedius*.

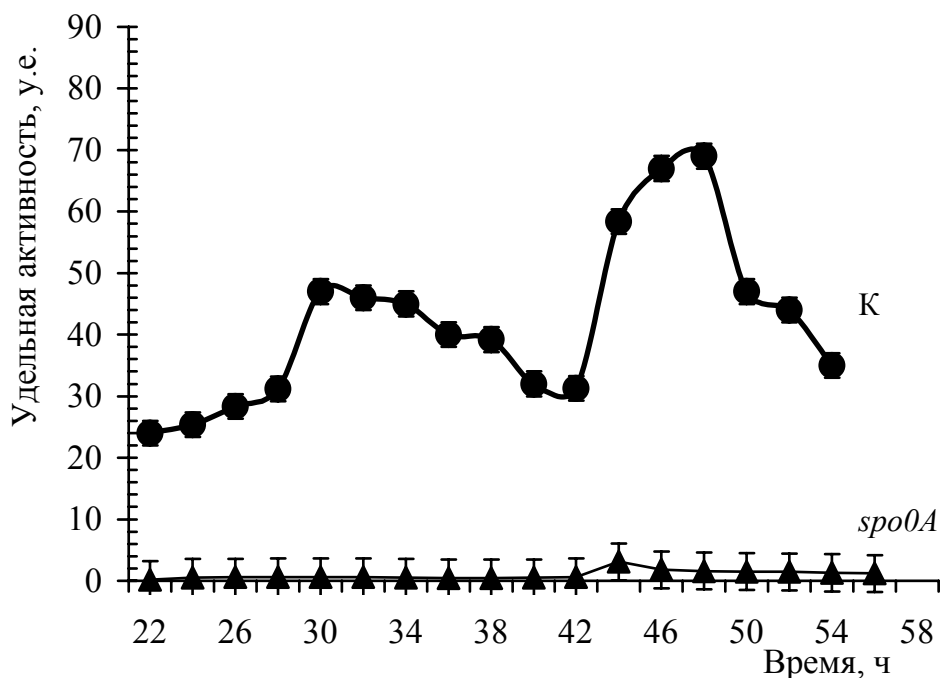


Рис. 9. Экспрессия гена *apr Vi* субтилизиноподобной протеиназы *B.intermedius* в культуральной жидкости рекомбинантных штаммов *B.subtilis*, дефектных по регуляторному белку Spo0A.

3. Влияние супрессорной *spo0AabrB* мутации на экспрессию гена субтилизиноподобной сериновой протеиназы. Исследовали характер экспрессии гена субтилизиноподобной сериновой протеиназы в супрессорных штаммах *B.subtilis*, мутантных одновременно по двум генам *spo0AabrB*, в которых *abrB*-мутация компенсирует дефект *spo0A*-гена, (рис. 10). В двойных мутантах *spo0A12abrB23* экспрессия гена *apr Vi* восстанавливается и превышает уровень контроля в среднем в 2 - 3 раза (рис. 10). Полученные данные подтверждают участие Spo0A - белка в позитивной регуляции экспрессии гена субтилизиноподобной протеиназы *B.intermedius*, а также позволяют нам сделать предположение о репрессирующем действии регуляторного белка AbrB на экспрессию гена субтилизиноподобной протеиназы.

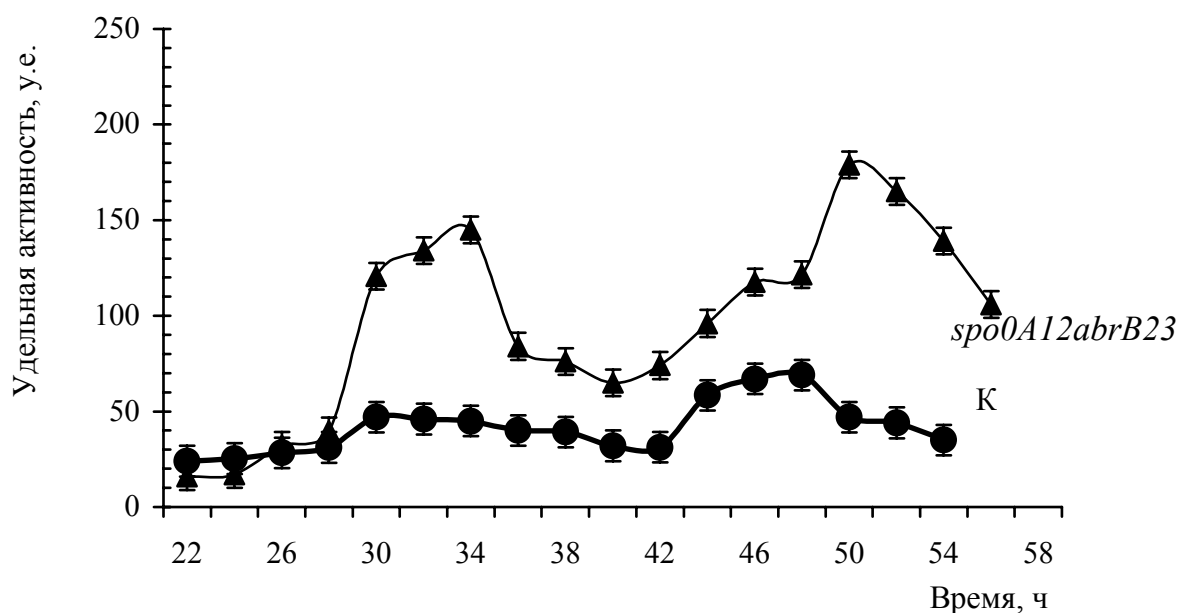


Рис. 10. Экспрессия гена *apr Vi* в мутантных штаммах *spo0AabrB*.

4. Влияние *kinA* мутаций на экспрессию гена субтилизиноподобной сериновой протеиназы. Для выяснения роли гистидин киназы KinA, участвующей в регуляторной системе Spo0A – фосфопередачи, в активации гена субтилизиноподобной сериновой протеиназы *B.intermedius* исследовали характер экспрессии гена *apr Vi* в штамме *B.subtilis*, мутантном по гену *kinA82* (рис. 11).

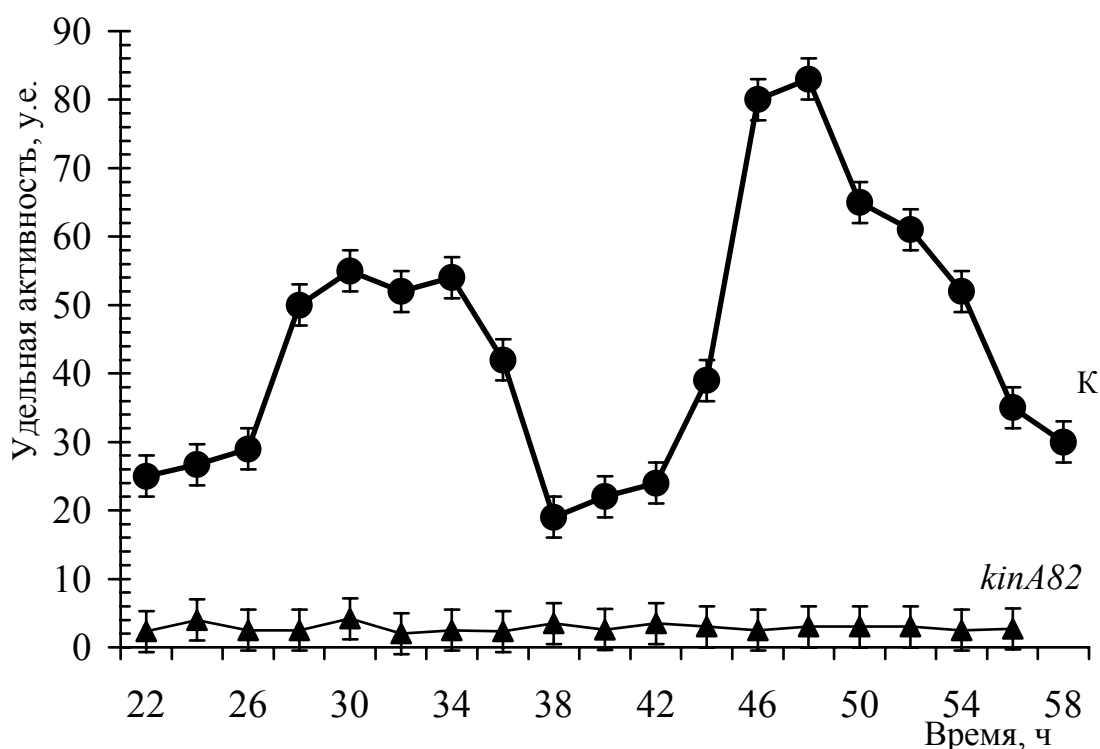


Рис. 11. Экспрессия гена *apr Vi* рекомбинантного штамма *B.subtilis*, дефектного по регуляторному белку KinA.

Нами установлено 95% ингибирование протеолитической активности в мутантном штамме по сравнению с контрольным вариантом. Таким образом, результаты свидетельствуют о возможном участии гистидин киназы KinA в позитивной регуляции экспрессии гена субтилизиноподобной протеиназы *B.intermedius*.

5. Влияние *spo0F* и *spo0B*-мутаций на экспрессию гена субтилизиноподобной сериновой протеиназы *B.intermedius*. Чтобы выяснить участвуют ли компоненты регуляторной системы Spo0A – фосфопередачи в активации гена *apr* Vi изучали экспрессию данного гена в Spo0F и Spo0B-мутантах. В штамме, *B.subtilis* JH649, мутантном по фосфотрансферазе Spo0F, уровень экспрессии гена субтилизиноподобной протеиназы снижался на 85-90% (рис. 12), по сравнению со штаммом с полноценным белком Spo0F. После трансформации плазмиды в *spo0B* – мутантный штамм уровень протеиназной активности в среде оставался низким при культивировании в течение 50 часов и составил 10% от контроля.

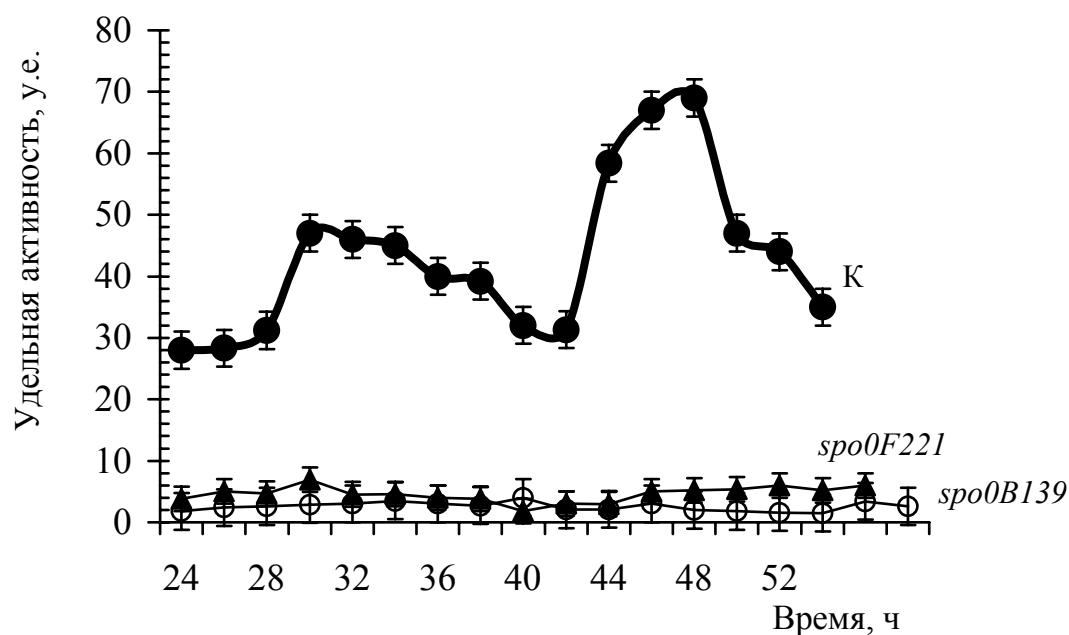


Рис. 12. Экспрессия гена *apr* Vi рекомбинантных штаммов *B.subtilis*, дефектных по регуляторным белкам Spo0F и Spo0B.

Таким образом, белки Spo0F и Spo0B, компоненты регуляторной системы Spo0A – фосфопередачи, должны быть в функционально-активном состоянии для положительной экспрессии гена *apr* Vi. Результаты свидетельствуют, что данная регуляторная система может участвовать в контроле экспрессии гена протеиназы. Более того, из этих данных следует, что белок Spo0A, выполняющий роль фактора транскрипции, должен находиться в фосфорилированном состоянии. Именно в активации этого белка участвуют Spo0F и Spo0B-белки, осуществляя это в процессе

последовательных фосфотрансферазных реакций (рис. 8). Полученные нами данные подтверждают важную роль фосфотрансфераз Spo0F и Spo0B в потоке фосфата на регуляторный Spo0A – белок.

6. Влияние *spo0E* и *spo0K*-мутаций на экспрессию гена субтилизиноподобной сериновой протеиназы *B.intermedius*. Поток фосфата через систему Spo0A-фосфопередачи может быть остановлен специфическими фосфатазами, к которым относится Spo0E фосфатаза, участвующая в дефосфорилировании белка Spo0A~P. В штамме *B.subtilis* JH647, мутантном по гену *spo0E*, уровень экспрессии гена *apr* Vi снижался в среднем до 20% (рис. 13 А). Полученные нами данные свидетельствуют о слабом влиянии *spo0E* мутации на экспрессию гена *apr* Vi.

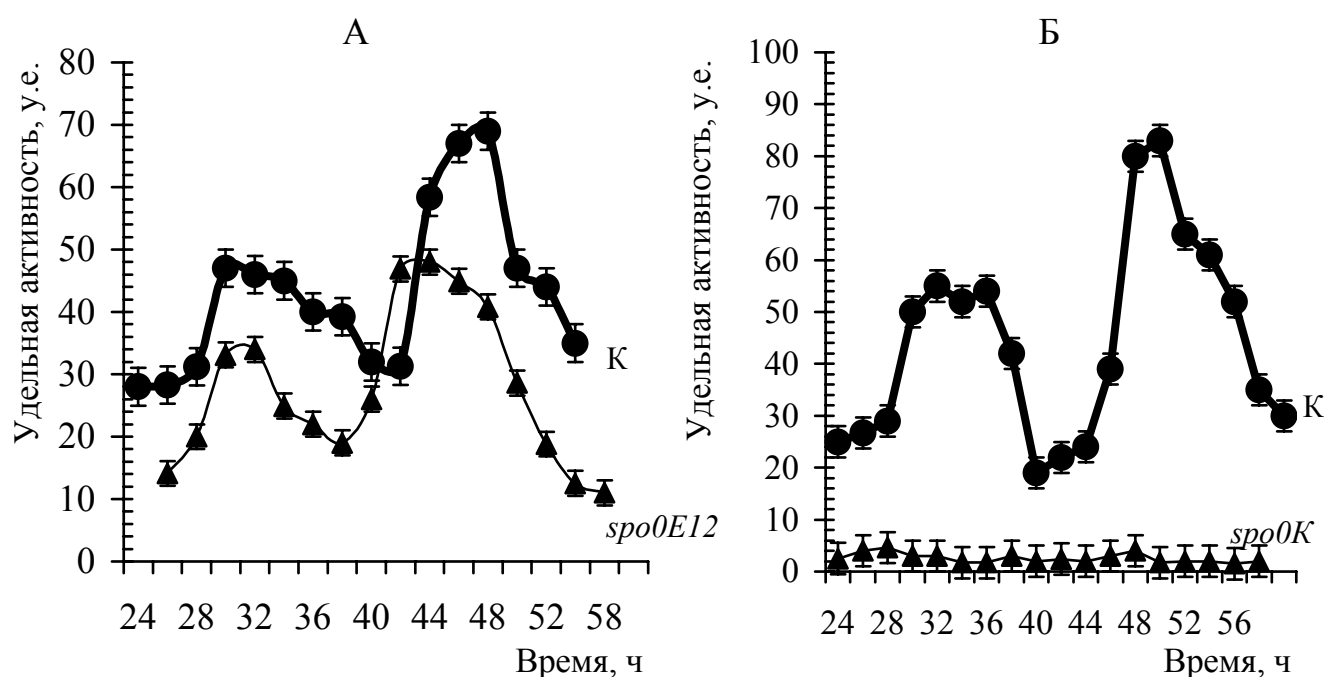


Рис. 13 Экспрессия гена *apr* Vi рекомбинантных штаммов *B.subtilis*, дефектных по белкам Spo0E (А) и Spo0K (Б).

В штамме, дефектном по Spo0K белку, который участвует в транспорте олигопептидов, экспрессия гена субтилизиноподобной протеиназы ингибировалась на 90% (рис. 13 Б). Отсутствие протеолитической активности в штамме, дефектном по Spo0K белку, свидетельствует о зависимости экспрессии гена *apr* Vi от Spo0K-регуляторного белка. Возможно, протеиназа участвует в деградации и процессинге специфических олигопептидов, предназначенных для транспорта внутрь клетки, на наружной стороне мембраны. Ранее установлено, что в процессе секреции в среду каталитически активная форма субтилизиноподобной протеиназы *B.intermedius* обнаруживается в мембране и отсутствует в цитоплазме (Шарипова с соавт., 2000).

На этом основании можно предположить, что субтилизиноподобная протеиназа может выполнять регуляторную роль в функционировании системы Spo0A-фосфопередачи.

7. Влияние спороспецифичных σ^H и σ^E факторов транскрипции на экспрессию гена субтилизиноподобной сериновой протеиназы. Наряду с двухкомпонентной системой контроль спорогенеза осуществляется путем системной регуляции спороспецифичными сигма – факторами транскрипции. В работе использовали штамм *B.subtilis* JH651, содержащий мутацию в гене *sigH81*. В штамме с инактивированным σ^H фактором транскрипции экспрессия гена *apr* Vi снижалась более чем на 90% по сравнению со штаммами с полноценным геном *spo0H* (рис. 14 А). Эти данные указывают на влияние *spo0H* мутаций на экспрессию гена субтилизиноподобной протеиназы. В штамме *B.subtilis*, не способном к синтезу протеазы, необходимой для процессинга σ^E фактора транскрипции, (рис. 14 Б) наблюдалось 90%-ное снижение уровня экспрессии гена субтилизиноподобной протеиназы.

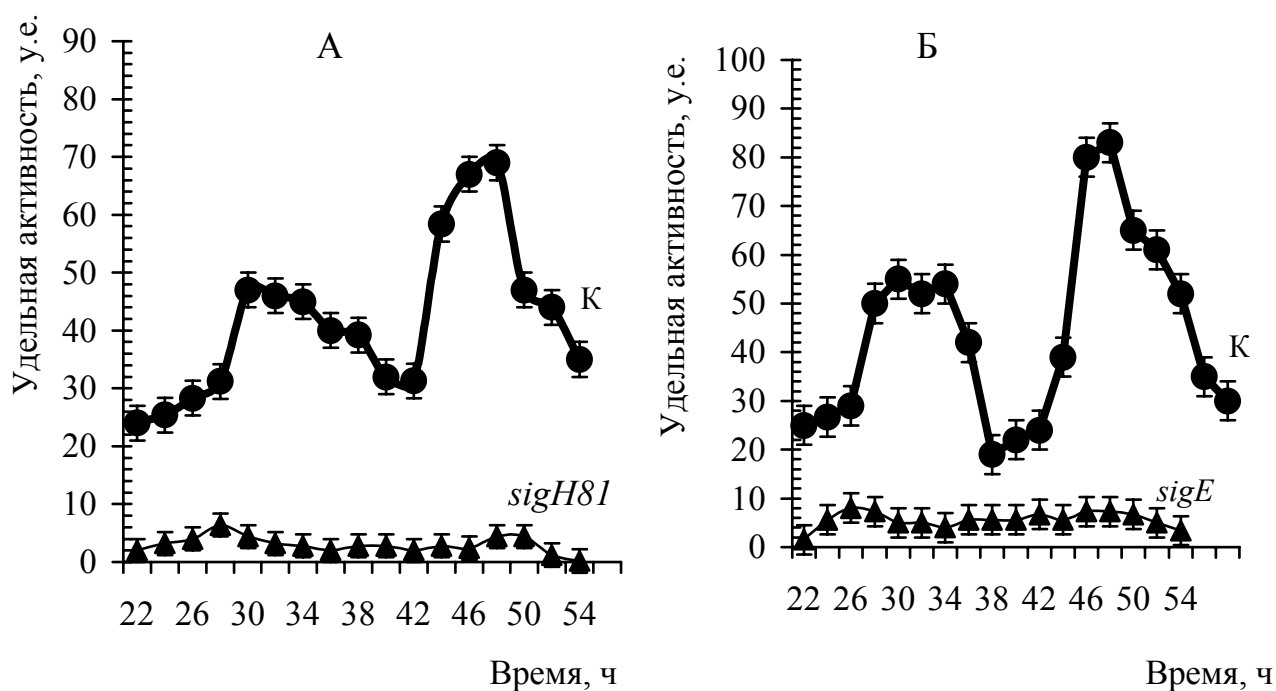


Рис. 14. Экспрессия гена *apr* Vi рекомбинантных штаммов *B.subtilis*, мутантных по спороспецифичным σ^H -фактору транскрипции (А) и σ^E -фактору транскрипции (Б).

Можно предположить, что регуляция экспрессии гена субтилизиноподобной протеиназы зависит от активации спороспецифичного σ^E – фактора транскрипции.

Возможно на стадиях созревания эндоспор и автолиза спорангия субтилизиноподобная сериновая протеиназа участвует в расщеплении структурных белков, образующих поверхность материнской клетки, и способствует освобождению эндоспор.

Таким образом, анализ промоторной области гена *apr Bi* и исследования с использованием мутантных штаммов, позволили нам установить что в регуляции экспрессии гена субтилизиноподобной протеиназы *B.intermedius* участвует система сигнальной трансдукции Spo0F/Spo0A-фосфопередачи, ответственная за инициацию спорообразования, а также механизмы глобальной регуляции - катаболитная репрессия, AbrB-репрессия и спороспецифичные σ -факторы транскрипции.

ВЫВОДЫ

1. Штамм *B.subtilis* AJ73, дефицитный по собственным внеклеточным ферментам, после трансформации в него плазмиды pCS9 с геном субтилизиноподобной протеиназы *B.intermedius* (*apr Bi*), выделяет фермент в среду в стационарной фазе роста с максимальной активностью на 28-й и 48-й часы роста. Первая фракция соответствует стадии инициации споруляции (0 стадия), вторая – завершению формирования эндоспор и выходу зрелых спор в среду (V-VII).
2. Основные закономерности экспрессии гена субтилизиноподобной протеиназы *B.intermedius* рекомбинантным штаммом *B.subtilis* сохраняются на стадиях раннего и позднего стационара - активация в присутствии ионов Ca^{2+} , неорганического фосфата и белковых субстратов. Установлены изменения в уровне экспрессии гена *apr Bi* в присутствии экзогенных факторов на разных стадиях роста (ионы Mg^{+2} и Mn^{+2} , белковые субстраты, сахара).
3. Экспрессия гена протеиназы и спорообразование корегулируются катаболитной репрессией в начале стационарной фазы роста и не регулируется этим механизмом в поздней стационарной фазе роста рекомбинантного штамма.
4. В позитивном контроле экспрессии гена *apr Bi* участвуют белки – компоненты регуляторной системы Spo0A-фосфопередачи: уровень экспрессии в штаммах *B.subtilis*, мутантных по Spo0A, Spo0B, Spo0F белкам снижается более, чем на 90%. Использование супрессорных штаммов *spo0AabrB* позволило установить, что регуляция экспрессии гена *apr Bi* осуществляется по механизму AbrB-репрессии.
5. Экспрессия гена *apr Bi* не зависит от Spo0E – фосфатазы, участвующей в специфическом дефосфорилировании Spo0A фактора транскрипции, и подвергается позитивной регуляции со стороны Spo0K регуляторного белка, участвующего в транспорте регуляторных олигопептидов.
6. Спороспецифичные σ^H и σ^E факторы транскрипции способны участвовать в положительном контроле экспрессии гена субтилизиноподобной сериновой протеиназы *B.intermedius* в клетках *B.subtilis*.

Публикации по теме диссертации

1. **Кадырова Ю.М.** Экспрессия гена субтилизина *Bacillus intermedius* рекомбинантным штаммом *Bacillus subtilis* / Ю.М. Кадырова, И.А. Зубахина, М.Р. Шарипова // Тезисы докладов II научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского государственного университета “Материалы и технологии XXI века”. - Казань, 16–17 марта, 2001. - С.83.
2. **Кадырова Ю.М.** Биосинтез внеклеточной фосфатазы и спорообразование у бактерий *Bacillus intermedius* / Ю.М. Кадырова, И.А. Курнева, М.Р. Шарипова // Тезисы докладов I научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского государственного университета “Материалы и технологии XXI века”. – Казань, 20-21 октября, 2001. – С.45.
3. Зубахина И.А. Синтез нейтральной протеиназы и субтилизина *B. intermedius* рекомбинантными клетками *B. subtilis* / И. А. Зубахина, **Ю. М. Кадырова**, М. Р. Шарипова // Тезисы докладов “IV Республиканская научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов”. - Казань, 11-12 декабря, 2001. – С.122.
4. Шарипова М.Р. Гидролитические ферменты и спорообразование у *Bacillus intermedius* / М.Р. Шарипова, Н.П. Балабан, Л.А. Габдрахманова, М.А. Шилова, **Ю.М. Кадырова**, Г.Н. Руденская, И.Б. Лещинская // Микробиология. - 2002. - Т.71. - №4. - С. 494-499.
5. Шарипова М.Р. Бациллы – продуценты внеклеточных протеиназ / М.Р. Шарипова, Н.П. Балабан, А.М. Марданова, Л.А. Габдрахманова, **Ю.М. Кадырова**, С.В. Костров, Г.Н. Руденская, И.Б. Лещинская // 1-й Международный конгресс “Биотехнология-состояние и перспективы развития”. - Москва, 14-18 октября, 2002. - С. 224-225.
6. **Кадырова Ю.М.** Внеклеточные протеиназы и спорогенез *Bacillus intermedius* / Ю.М. Кадырова, И.А. Зубахина, О.Р. Латыпов // Материалы XI Международной научной студенческой конференции “Студент и научно-технический прогресс”. – Новосибирск, 2002. - С. 80.
7. **Кадырова Ю.М.** Экспрессия в *Bacillus subtilis* гена субтилизина *Bacillus intermedius* / Ю.М. Кадырова //Сборник тезисов итоговой конференции Республиканского конкурса научных работ среди студентов и аспирантов на соискание премии им. Н. И. Лобачевского. – Казань, 1-2 марта, 2002. – С. 165.
8. **Kadyrova J.M.** Expression of *Bacillus intermedius* serine protease in *Bacillus subtilis* recombinant strains / J.M. Kadyrova, M.R. Sharipova, N.P. Balaban, A.M.

- Mardanov, L.A. Gabdrakhmanov, S.V. Kostrov, G.N. Rudenskaya, I.B. Leshchinskaya // FEMS Congress of European Microbiologist "Bacillus-2003". - Ljubljana, Slovenia, 1-3 July, 2003. – P.29.
9. **Кириллова Ю.М.** Биосинтез субтилизиноподобной сериновой протеиназы *B.intermedius* рекомбинантным штаммом *B.subtilis* / Ю.М. Кириллова, Е.О. Михайлова, М.Р. Шарипова // Сборник тезисов 9-й Пущинской школы-конференции молодых ученых "Биология – наука XXI века". - Пущино, 18-22 апреля, 2005. - С. 203.
 10. **Кириллова Ю.М.** Закономерности биосинтеза протеиназы *Bacillus intermedius* рекомбинантным штаммом *Bacillus subtilis* AJ73 / Ю.М. Кириллова, Е.О. Михайлова, А.Р. Каюмов, М.Р. Шарипова // Материалы XIII международной научной конференции "Ферменты микроорганизмов: структура, функции, применение". - Казань, 4-8 апреля, 2005. С. 44-45.
 11. Михайлова Е.О. Особенности биосинтеза субтилизиноподобной сериновой протеиназы *Bacillus intermedius* в рекомбинантном штамме *Bacillus subtilis* / Е.О. Михайлова, **Ю.М. Кириллова**, М.Р. Шарипова // Материалы V республиканской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов "Наука. Инновации. Бизнес". - Казань, 9 июня, 2005. - С. 72-73.
 12. **Кириллова Ю.М.** Биосинтез субтилизиноподобной сериновой протеиназы *B.intermedius* рекомбинантным штаммом *B.subtilis* AJ 73 / Ю.М. Кириллова, Е.О. Михайлова, Н.П. Балабан, М.Р. Шарипова // Материалы V научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского государственного университета "Материалы и технологии XXI века". – Казань, 26-27 апреля, 2005. - С. 51.
 13. Михайлова Е.О. Биосинтез субтилизиноподобной сериновой протеиназы *B.intermedius* рекомбинантным штаммом *B.subtilis* AJ 73 / Е.О. Михайлова, **Ю.М. Кириллова**, М.Р. Шарипова // Материалы Молодежной школы конференции "Актуальные аспекты современной микробиологии". – Москва, 1-3 ноября, 2005. - С. 97-98.
 14. Байрамов Р.А. Биосинтез внеклеточных сериновых протеиназ *Bacillus intermedius* рекомбинантным штаммом *Bacillus subtilis* / Р.А. Байрамов, Е.О. Михайлова, А.Р. Сабирова, **Ю.М. Кириллова** // Материалы XLIII международной научной студенческой конференции "Студент и научно-технический прогресс". – Новосибирск, 2005. - С. 89-90.
 15. **Кириллова Ю.М.** Условия роста культуры и биосинтеза субтилизиноподобной сериновой протеиназы *Bacillus intermedius* рекомбинантным штаммом *Bacillus subtilis* / Ю.М. Кириллова, Е.О. Михайлова, Н.П. Балабан, Марданова А.М.,

- Руденская Г.Н., Костров С.В., Шарипова М.Р. // Микробиология. –2006. – Т.75. - №2. – С. 172-178.
16. **Кириллова Ю.М.** Особенности биосинтеза субтилизиноподобной сериновой протеиназы *Bacillus intermedius* рекомбинантным штаммом *Bacillus subtilis* / Ю.М. Кириллова, Е.О. Михайлова, Н.П. Балабан, Марданова А.М., Каюмов А.Р., Руденская Г.Н., Костров С.В., Шарипова М.Р. // Микробиология. –2006. – Т.75. - №2. –С. 179-185.
17. Sharipova M. The expression of the serine proteinase gene of *Bacillus intermedius* in *Bacillus subtilis* / M. Sharipova, N. Balaban, A. Kayumov, **Y. Kirillova**, L. Gabdrakhmanova, A. Mardanova, I. Leshchinskaya, G. Rudenskaya, T. Akimkina, D.Safina, I. Demidyuk, S. Kostrov // Microbiol. Res. - 2006. (принята в печать).

Автор выражает глубокую благодарность профессору кафедры микробиологии, д.б.н. Маргарите Рашидовне Шариповой за постоянное внимание к работе, в.н.с., канд. биол. наук Нэлли Павловне Балабан и доценту кафедры микробиологии, канд. биол. наук Айсылу Миркасымовне Мардановой за оказанную помощь в работе, профессору Сергею Викторовичу Кострову (Институт молекулярной генетики РАН) за любезное предоставление плазмиды pCS9, использованной в работе, и возможность пройти научную стажировку в возглавляемой им научной лаборатории генной инженерии, профессору (Института генетики и селекции промышленных микроорганизмов) Ю. Йомантасу за предоставленный штамм *B.subtilis* AJ73, профессору Д. Зайглеру из Bacillus Genetic Stock Center (университет Охайо, США) за предоставленные для работы штаммы *B.subtilis*, дефектные по *spo* - генам.